

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-522936

(P2003-522936A)

(43) 公表日 平成15年7月29日 (2003. 7. 29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 27/04		G 0 1 N 27/04	Z 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 6
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 6 0
G 0 1 N 27/12		G 0 1 N 27/12	Z 4 B 0 2 9
27/22		27/22	Z 4 B 0 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-545578(P2001-545578)
 (86) (22) 出願日 平成12年12月13日 (2000. 12. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年6月4日 (2002. 6. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE00/04438
 (87) 国際公開番号 WO01/044501
 (87) 国際公開日 平成13年6月21日 (2001. 6. 21)
 (31) 優先権主張番号 199 60 076. 7
 (32) 優先日 平成11年12月13日 (1999. 12. 13)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 ノヴェンバー アクティエンゲゼルシャフ
 ト ゲゼルシャフト フューア モレクラ
 ーレ メディツィーン
 NOVEMBER AKTIENGES
 ELLSCHAFT GESELLSCHA
 FT FUR MOLEKULARE M
 EDIZIN
 ドイツ連邦共和国 エルランゲン 91056
 ウルリッヒ-シャルクーシュトラーセ
 3 a
 (74) 代理人 弁理士 小笠原 史朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子の検出および定量化方法、および装置

(57) 【要約】

本発明は、溶液中の第1の生体分子 (5、8) を検出および/または定量化する方法であって、a) 第1の分子 (5、8) を、第1の生体分子に対して特定の親和性を、少なくともセグメントに沿って有する第2の生体分子 (3、7) に結合させるステップ、およびb) 第1の生体分子 (3、7) と第2の生体分子 (5、8) とから成る錯体の伝導性を測定し、これにより第2の生体分子 (3、7) が第1の電極2 aと第2の電極2 bとの間にブリッジを形成するステップを含む方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 溶液中の第1の生体分子（5、8）を検出および／または定量化する方法であって、

a) 第1の生体分子（5、8）を、第1の生体分子（5、8）に対して特定の親和性を、少なくともセクション内に有する第2の生体分子（3、7）に結合させるステップ、および

b) 第1の生体分子（3、7）と第2の生体分子（5、8）とから成る複合体の伝導性を測定し、第2の生体分子（3、7）が第1の電極（2 a）と第2の電極（2 b）との間にブリッジを形成するステップを含む、方法。

【請求項2】 ステップaの前に、第2の生体分子（5、8）が、その一方端（E 1）で電極（2 a、2 b）のいずれかと結合されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 第2の生体分子（5、8）の少なくとも一方端（E 1）と電極（2 a、2 b）との結合には、スペーサ分子（S）および／またはリンカ分子が介在することを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項4】 ステップaの前または後に、第2の生体分子（5、8）が、その他方端（E 2）で第2の電極（2 b）に結合されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 他方端（E 2）の結合は、電位の印加により補佐されることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項6】 電荷担体（6）が、第2の生体分子（3、7）の他方端（E 2）に結合されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 電荷担体（6）は、メタルクラスタ、有機分子、または錯化剤であって、他方端（E 2）と第2の電極（2 b）との結合には、電荷担体（6）が介在することを特徴とする、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 ステップaは、第2の生体分子（3、7）の一方端（E 1）と第1の電極（2 a）との結合、および第2の生体分子（3、7）の他方端（E 2）と第2の電極（2 b）との結合の間に行われることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 第1の電極(2a)と第2の電極(2b)とは、絶縁基材(1)上に配置されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 ステップbの前に、基材(1)の洗浄、および／または乾燥、および／または排気が行われることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 第1の電極(2a)と第2の電極(2b)との間で結合される複合体の伝導性が測定されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項12】 第1の電極(2a)と第2の電極(2b)との間で結合される複合体のキャパシタンスが、伝導性の代わりに測定されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項13】 第1の電極(2a)と第2の電極(2b)との間で結合される複合体のインピーダンスが、伝導性の代わりに測定されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項14】 第1の電極(2a)と第2の電極(2b)との間の距離が3nmから1 μ m、好ましくは50nmであることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項15】 第1の生体分子(3、7)は、第2の生体分子(5、8)に対して相補的な1本鎖DNAまたはRNAであることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項16】 第2の生体分子(5、8)は2本鎖構造のセクションから形成され、2本鎖セクションは好ましくはDNAおよび／またはRNAから形成されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項17】 1本鎖セクションが第2の生体分子(5、8)に挿入されていることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項18】 1本鎖セクションはDNA、RNA、またはPNAから形成されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項19】 タンパク質またはペプチドは第2の生体分子(5、8)に会合されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項20】 ステップbに続いて、第1の生体分子(5、8)から第2の生体分子(3、7)を除去するために、電圧の印加により第1の生体分子(5、8)上に力を作用させることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項21】 ステップbに続いて、第1の生体分子(5、8)から第2の生体分子(3、7)を除去するために、基材(1)が洗浄されることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項22】 溶液中の第1の生体分子(5、8)を検出および／または定量化するための装置であって、

a a) 第1の電極(2a)および第2の電極(2b)は絶縁基材(1)上に配置され、

b b) 第2の生体分子(3、7)には少なくとも第1の電極(2a)の一方端(E1)が結合され、第2の生体分子は、少なくともそのセクション中に、第1の生体分子(5、8)に対して親和性を有し、

c c) 第1の電極(2a)と第2の電極(2b)との間の距離は、第2の生体分子(3、7)の他方端(E2)を結合することにより、第1の電極(2a)と第2の電極(2b)との間にブリッジが形成されるように選択されることを特徴とする、装置。

【請求項23】 第1の電極(2a)と第2の電極(2b)との間の距離は3nmから1 μ m、好ましくは50nmであることを特徴とする、請求項22に記載の装置。

【請求項24】 第2の生体分子(5、8)の少なくとも一方端(E1)が、直接結合、スペーサ分子(S)、および／またはリンカ分子(L)を介して電極(2a、2b)に結合されることを特徴とする、請求項22または23に記載の装置。

【請求項25】 電荷担体(6)が、第2の生体分子(3、7)の他方端(E2)に結合されていることを特徴とする、請求項22から24のいずれかに記載の装置。

【請求項26】 電荷担体(6)は、メタルクラスタ、有機分子、または錯

化剤であって、他方端（E 2）と第2の電極（2 b）との結合には電荷担体（6）介在することを特徴とする、請求項22から25のいずれかに記載の装置。

【請求項27】 基材（1）はセラミック、シリコン化合物、好ましくは酸化被膜を伴うシリコン、雲母、または絶縁性ポリママトリックスから形成されることを特徴とする、請求項22から26のいずれかに記載の装置。

【請求項28】 第1の生体分子（3、7）と第2の生体分子（5、8）とから成る構造体の伝導性を測定するための手段を備え、前記手段は第1の電極（2 a）と第2の電極（2 b）とに接続されることを特徴とする、請求項22から27のいずれかに記載の装置。

【請求項29】 前記手段を用いて、第1の生体分子（5、8）および第2の生体分子（3、7）とから成る構造体のキャパシタンスを、伝導性の代わりに測定することを特徴とする、請求項28に記載の装置。

【請求項30】 前記手段を用いて、第1の生体分子（5、8）および第2の生体分子（3、7）とから成る構造体のインピーダンスを、伝導性の代わりに測定することを特徴とする、請求項28に記載の装置。

【請求項31】 第1の生体分子（5、8）は、第2の生体分子（3、7）に対して相補的な1本鎖DNAまたはRNAであることを特徴とする、請求項22から30のいずれかに記載の装置。

【請求項32】 第2の生体分子（3、7）は2本鎖構造のセクションから形成され、2本鎖セクションは好ましくはDNAおよび／またはRNAから形成されることを特徴とする、請求項31に記載の装置。

【請求項33】 1本鎖セクションは、第2の生体分子（3、7）に挿入されていることを特徴とする、請求項32に記載の装置。

【請求項34】 1本鎖セクションはDNA、RNA、またはPNAから形成されることを特徴とする、請求項22から33のいずれかに記載の装置。

【請求項35】 タンパク質またはペプチドが第2の生体分子（3、7）に挿入されていることを特徴とする、請求項22から34のいずれかに記載の装置。

【請求項36】 第1の電極（2 a）および第2の電極（2 b）が多数、基

材(1)上に配置されていることを特徴とする、請求項22から35のいずれかに記載の装置。

【請求項37】 第1の電極(2a)に結合される第2の生体分子(3、7)はそれぞれ異なるため、多数の第1の生体分子(5、8)の検出および／定量化が同時に行われ得ることを特徴とする、請求項22から36のいずれかに記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、溶液中に存在する第1の生体分子の検出および定量化方法、および装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

DNAなどのポリヌクレオチド配列の検出には、ボルタンメトリ法の使用が先行技術により既知である。米国特許5,312,572号において、さらにDNAを含む溶液にレドックス活性分子を添加する方法が提案されている。DNAをハイブリダイズすると、レドックス活性分子が結合して2本鎖DNA分子が形成される。レドックス活性分子により、測定可能なレドックスシグナルが生じる。

【0003】

類似の方法としては、米国特許5,871,918号、および5,874,046号に、ドーピングされたオリゴヌクレオチド配列が電極に結合しているセンサシステムが開示されている。オリゴヌクレオチド配列をハイブリダイズすると増加する伝導性が、例えばサイクリックボルタンメトリを用いて間接的に測定される。オリゴヌクレオチドのドーピングは複雑であり、サイクリックボルタンメトリにより伝導性を間接的に測定する場合、その感度は低くなる。

【0004】

WO96/01836では、ポリヌクレオチド配列を検出するための、いわゆるチップを開示している。このチップはシリコンなどの基材から成る。チップ上には小型化された (minuaturized) 反応領域が多数設けられている。反応領域のそれぞれには、ある特定のポリヌクレオチド配列が結合されている。検出対象のポリヌクレオチド配列を含む溶液内にチップを浸すと、ポリヌクレオチド配列の内の1つがハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーションは蛍光で検出される。

【0005】

WO95/12808も同じく、チップを用いたポリヌクレオチド配列の検出

方法に関する。電極と同じ要領で、チップ全体に電圧を印加する。これにより、溶液中の電荷ポリヌクレオチド配列は、チップ表面、またはチップ上の小型化反応領域で蓄積される。

【0006】

米国特許5, 591, 578号に、対象となる1本鎖核酸配列を特定するためのボルタンメトリ検出法が開示されている。対象となる核酸配列に対して相補的な核酸配列は、電極に共有結合されている。レドックス活性トランジション金属錯体は、前記核酸配列に共有結合されている。ハイブリダイゼーションの際には、増加したレドックスシグナルが測定される。

【0007】

米国特許5, 783, 063号には、核酸サンプルを特徴づけるためのパラメタ評価方法が開示されている。

【0008】

DE198 08 884には、相互に作用し、かつ共に1つの分子に結合されている2つのフルオロ基を用いて化学物質を検出する方法が記載されている。ある特定の付加を行う場合、このフルオロ基間の相互作用に変化が生じる。

【0009】

DE198 11 732には微量定量プレートが記載されている。このプレートには、共有結合されたオリゴヌクレオチドがコーティングされている。この微量定量プレートは、PCRによる生成物の検出にも使用され得る。

【0010】

WO99/47700は、蛍光を用いてヌクレオチド配列を検出する方法に関する。フルオロ基を含む分子は固相に結合されている。対象となる配列が存在する場合、第2のフルオロ基は、フルオロ基間で無輻射遷移、または直接エネルギー遷移が可能になるように付着している。

【0011】

WO99/47701には、PCRによるヌクレオチド配列検出方法が開示されている。PCRは3つのプライマを使って行われ、第3のプライマは固相上で結合される。反応物質の濃度を増加させ、かつ反応時間を短縮するために使用さ

れる。

【0012】

「DNAフィルムを介する長距離電子移動」Kelly, S. O., Ang, Chem. Int. Ed 38, (7), 941 (1999)、により、2本鎖DNAにおいて、長距離電子移動が行われることが知られている。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

上記従来のDNA検出方法は複雑であり、例えばレドックス活性分子の添加を必要とする。上記方法では、検出対象のDNAまたは生体分子を正確に定量化することは不可能である。さらに、検出に使用する光学システムにはかなり高額な装置が必要とされる。

【0014】

本発明の目的は、従来の方法の不都合な点を解消することにある。特に、非常に高感度な方法、かつ溶液中に存在する少量の生体分子の検出と定量化とを同時に行うための装置を特定することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段および発明の効果】

本目的は、請求項1および21に記載の特徴によって達成される。請求項2から20、および22から36の特徴に基づいて、適宜実施形態を記載する。

【0016】

本発明によれば、溶液中の第1の生体分子を検出および／または定量化する方法であって、

- a) 第1の分子を、第1の生体分子に対して特定の親和性を、少なくともセクション内に有する第2の生体分子に結合させるステップ、および
- b) 第1の生体分子と第2の生体分子とから成る複合体の伝導性を測定し、第2の生体分子が第1の電極と第2の電極との間にブリッジを形成するステップを含む、方法が提供される。

【0017】

上記方法は極めて感度が高い。例えば第1および第2の生体分子から2本鎖複

合体が形成される場合、第1および第2の電極の間に形成されるブリッジにより電氣的性質の変化を検出することができる。したがって、溶液中の生体分子を個々に検出することができる。さらに、非常に少量でも定量化が可能である。

【0018】

生体分子という用語は、少なくともそのセクション内で互いにある特定の親和性を有する分子であって、結合セクションに沿って相互結合が生じた場合、その電氣的性質に変化が生じる分子を意味する。特に、「生体分子」は、核酸から形成される分子を意味する。このタイプの分子は、少なくとも共有結合された2つのヌクレオチドを有する。核酸は、通常ホスホジエステル結合を含む。代わりに、ホスホアミド、ホスホロジチオン酸塩、0-メチルホスホアミド結合、プチ核酸結合等を含んでいてもよい。核酸は1本鎖でも2本鎖でもよい。生体分子は、DNA、RNA、ハイブリッドのいずれかで構成され、核酸はデオキシリボ核酸およびリボ核酸の組み合わせを含む。さらに、タンパク質PNAなども「生体分子」として理解される。

【0019】

本発明では、2つの分子は互いに「特異的な」親和性を有し、例えば水素結合、ファンデルワースカイオン結合、または共有結合などの誘引的相互作用の結果、水素結合などのように相互作用が弱くなると互いに結合し始める、または少なくとも結合する傾向になる。このタイプの親和性を有するのは、例えば抗原/抗体、ストレプトアビジン/ビオチン、リガンド/レセプタ、および相補的核酸配列などの分子である。

【0020】

「複合体」という用語は、分子相互の親和性により構成体が形成される、少なくとも2つの分子の集まりを意味する。

実施形態によれば、ステップaの前に、第2の生体分子がその一方端によって電極のいずれかと結合される。第2の生体分子の少なくとも一方端と電極との結合には、スペーサ分子および/またはリンカ分子が介在する。さらなる実施形態によれば、ステップaの前または後に、第2の生体分子が、その他方端で第2の電極に結合される。後者の場合、他方端の結合は、電位の印加により補佐されて

もよい。適切な電位域で電荷された分子（以下、電荷担体と称する）を、第2の生体分子の何も結合されていない方の端と結合させてもよい。これにより、特に第2の生体分子が電荷されていない場合、静電気の力でブリッジが形成され得る。もちろん、電荷された第2の生体分子に電荷担体を付与してもよい。電荷担体は、例えば、メタルクラスタ、有機分子、または錯化剤を含んでいてもよい。

【0021】

ステップaは、第2の生体分子の一方端と第1の電極との結合、および第2の生体分子の他方端と第2の電極との結合の間に行われることが好ましい。ステップaにおいて、第1の生体分子と第2の生体分子との結合は、電界によって促進されてもよい。電界は、例えば、電極への電位の印加により形成される。さらに、上記方法による利点は、電位が変化するとストリンジェントも変化し得ることにある。

【0022】

実施形態の変形例は、第1の生体分子の性質に基づいて選択される。本例では、第1の生体分子の3次元的広がりとその電荷により、ある特定の役割が与えられる。

【0023】

第1の電極と第2の電極とは、絶縁基材上に適宜配置される。さらなる変形例によれば、基材は、ステップbの前に洗浄、および／または乾燥、および／または排気されてもよい。

【0024】

さらなる実施形態の特徴によれば、第1の電極と第2の電極との間で結合される複合体の伝導性が測定される。伝導性の代わりに、第1の電極と第2の電極との間で結合される複合体のキャパシタンスおよび／またはインピーダンスを測定することも可能である。上記電気変数を測定することにより、少なくともそのセクション内に第2の生体分子に対する親和性を有する生体分子の検出および／または定量化が可能になる。

【0025】

第1の電極と第2の電極との間の距離が3 nmから1 μ m、好ましくは50 n

mであると有利であることが証明されている。

第1の生体分子は、第2の生体分子に対して相補的な1本鎖DNAまたはRNAである。

【0026】

さらに、第2の生体分子は2本鎖構造のセクションから形成され、2本鎖セクションは好ましくはDNAおよび／またはRNAから形成される。

また、1本鎖セクションが第2の生体分子に挿入されていてもよく、1本鎖セクションはDNA、RNA、またはPNAから形成されてもよい。さらに、タンパク質またはペプチドは第2の生体分子に挿入されてもよい。これにより、溶液中に第1の生体分子として存在するという条件で、抗体などの検出が可能になる。

【0027】

第1の生体分子を検出する際の感度は、ストリンジェントな条件下での管理により調整され得る。ストリンジェントな条件は、例えば電極への印加電圧を変化させることにより変更可能であり、さらにそれぞれの環境に合わせることもできる。

【0028】

方法をさまざまな形で実現するために、ステップbに続いて、第1の生体分子から第2の生体分子を除去するために、電圧の印加により第1の生体分子上に力を作用させる。さらに、ステップbに続いて、基材を洗浄および／または加熱してもよい。加熱は、第1の生体分子を熱変性させる。好ましくは、第1の生体分子は予め決められた温度で結合される。加熱、または温度を調節することにより、本方法のさらなる特異性が向上される。特異性は、溶液のpHを変化させたり、塩濃度で調節することによっても向上され得る。

【0029】

第1および第2の生体分子から成る複合体の伝導性を向上させるために、溶液にインターカレータを加えてもよい。インターカレータは2本鎖分子に接合、または介在する分子であってホッピングセンタ (hopping center) を形成する、またはその他メカニズムによって伝導性を上昇させる分子である。

【0030】

さらに本発明によれば、溶液中の第1の生体分子を検出および／または定量化するための装置であって、

a a) 第1の電極および第2の電極は絶縁基材上に配置され、

b b) 第2の生体分子には少なくとも第1の電極の一方端が結合され、第2の生体分子は、少なくともそのセクション中に、第1の生体分子に対して特異的親和性を有し、

c c) 第1の電極と第2の電極との間の距離は、第2の生体分子の他方端を結合することにより、第1の電極と第2の電極との間にブリッジが形成されるように選択されることを特徴とする、装置が提供される。

【0031】

本発明の装置により非常に高感度な検出が可能になり、さらには溶液中の第1の生体分子の定量化も可能になる。

【0032】

電極は、例えばゴールド、伝導性プラスチック、またはグラファイトなどの伝導性材料から成る。さらに、電極はナノチューブなどの微小電極の形をとって設計されてもよい。

【0033】

実施形態によれば、電極は選択電圧域のレドックス不活性分子でコーティングされる。このコーティングにより、汚れに起因する伝導現象が抑制される。

【0034】

本装置のさらなる利点に関しては、上記説明を参照されたい。

【0035】

装置側におけるさらなる特徴によれば、第1の電極および第2の電極が多数、基材上に配置されている。好ましくは、第1の電極に結合される第2の生体分子はそれぞれ異なるため、多数の第1の生体分子の検出および／定量化が同時に行われ得る。したがって、本発明のチップは、溶液中の第1の生体分子の検出および／または定量化が容易に可能であるという利点を有する。定量化はデジタル方式で行われ得る。その場合、ブリッジがそれぞれ特定のシグナルを発生するとい

う事実を好適に利用することができる。さらに、かなり高額な装置を必要とする光学検出装置も必要としない。

【0036】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して、本発明の例示的な実施形態をより詳しく説明する。

図1は、本発明の装置の第1の実施形態の例を示す。

図2は、本発明の装置の第2の実施形態の例を示す。

図3は、本発明の装置の第3の実施形態の例を示す。

図4は、第1の方法の変形例を示す図である。

図5は、第2の方法の変形例を示す図である。

図6は、第3の方法の変形例を示す図である。

図7aからcは、第4の方法の変形例のサブステップを示す図である。

図8aからdは、第5の方法の変形例のサブステップ、および測定結果を示す図である。

【0037】

図1から図3において、シリコン、酸化被膜を伴うシリコン、石英、ガラスまたは雲母等から成る、実質的に絶縁性を有する基材を参照符号1で示す。基材1上には、第1の電極2aおよび第2の電極2bが配置される。理解しやすいように、図1および図2において、電極2aおよび2bと測定手段（図示せず）との間の電気接続は単独では図示しない。1本鎖DNA3は、1方端E1により第1の電極2aに結合され、他方端E2により第2の電極2bに結合される。これにより、2つの電極2aおよび2bは架橋状に接続される。

【0038】

例えば、1方の端E1だけ第1の電極2aに結合させ、他方の端E2は自由に可動可能なようにしておくこともできる。この場合、デントリマ（dentrimer）を第2の端E2に結合させるのが好ましい。第2の端E2は、電位印加により第2の電極2bに接着され、およびゴールドクラスタにより結合されてもよい。

【0039】

図3に本発明のチップを示す。それぞれ独立の多数の第1の電極2aが、共通

の第2の電極2bを挟んで向き合うように配置されている。第1の電極2aは、それぞれ個別の供給線4を有する。チップは、従来のリトグラフ技術に基づいて製作される。理解しやすいように、第1の電極2aと第2の電極2bとを接続する生体分子は図示しない。

【0040】

図4に、第1の1本鎖DNA分子5を検出するための第1の変形例を示す。第1の電極2aは、Sで示されるスペーサ分子を介して第2の1本鎖DNA分子3と結合される。第2のDNA分子3の他方端E2にはゴールドクラスタ6が配置される。ここで、第2のDNA分子3により、まず第1の電極2aと第2の電極2bとの間に電位を印加して架橋状接続を確立させる。ゴールドクラスタ6が他方端E2と第2の電極2bとの間の結合を促進させる。溶液中の第1のDNA分子5は第2のDNA分子3に対して相補的である。図中の装置が溶液と接触すると直ちに、第2のDNA分子3は、自身に相補的な第1のDNA分子5に対してハイブリダイズされる。この結果生成される2本鎖DNA分子は、第1の電極2aと第2の電極2bとを接続する第2の1本鎖DNA分子よりも極めて高い伝導性を有する。このように伝導性が極めて高くなるのは、ハイブリダイゼーションが実質的に完全な状態で行われた場合に限る。上記方法によれば、かなり高い感度で、溶液中の第1のDNA分子5の存在を検出することが可能である。

【0041】

図5に示す第2の変形例は、抗体8の検出に極めて適している。本例では、生体分子7が第1の電極2aと第2の電極2bとを接続している。生体分子はセクションが2本鎖構造であって、端E1およびE2がスペーサ分子Sによってそれぞれ第1の電極2aと第2の電極2bとに接続される。1本鎖ペプチド配列7aが第1の生体分子7に挿入されている。溶液中に対応する抗体が存在する場合、1本鎖ペプチド配列7aに結合される。これにより、溶液中の抗体8が簡単に検出できる。

【0042】

図6に示す第3の変形例において、ヘアピンループ9が生体分子7のストランドに形成される。ヘアピンループ9の部分で、その反対に位置するストランドが

インタラプトされる。抗体8が対応の1本鎖ペプチドセクション7aに結合されると、その構造に変化が生じる。この結果形成される構成体は収縮し、ヘアピンループ9が伸長する。インタラプトを制限する反対側のストランドの両端は互いに遠ざかる。抗体8が1本鎖ペプチドセクション7aに結合すると、これまでの伝導性が減少していく。したがって、溶液中に存在する抗体8を簡単に検出することができる。

【0043】

第4の変形例を図7aから7cに示す。第1の生体分子、例えば第1のDNA分子5に相補的な第2の生体分子、例えば第2のDNA分子3が、リンカLにより第1の電極2aに結合される。第2のDNA分子3の他方端には、電荷分子10が結合される。第1のDNA分子5を含む溶液に接触すると直ちに、第1のDNA分子5が第2のDNA分子3に対してハイブリダイズされる。その後、洗浄が行われ、第1の電極2aと第2の電極2bとの間に電圧が印加される。電荷分子10上に力を作用させる。電荷分子10は第2の電極2bに誘引される（図7c参照）。ブリッジが形成され、この形成されたブリッジを介して、簡易な電流／電圧測定法により、2本鎖複合体の伝導性を直接的に測定することができる。この測定は、溶液がなくても、つまり乾いた状態でも可能である。

【0044】

第5の変形例を図8aから図8cに示す。図8dは、この例における測定結果を示す。図8aから図8cに、第1の電極2aと第2の電極2bを複数含むアレイのセクションを示す。それぞれ異なる第2の生体分子、例えば第2のDNA分子3、3'、および3"は、リンカにより第1の電極2aに結合される。このタイプの電極アレイを、それぞれ異なる第1の生体分子、例えば第1のDNA分子5、5^{*}、および5"を含む溶液に接触させると、第1のDNA分子5、5^{*}、および5"の第2のDNA分子3、3'、および3"に対する親和性に応じてハイブリダイゼーションが行われる。本変形例では、第1のDNA分子5が第2のDNA分子3に対してハイブリダイズされ、第1のDNA分子5"が第2のDNA分子3"に対してハイブリダイズされる。第2のDNA分子3'は、溶液中の第1のDNA分子5^{*}に対して相補的ではない。電極アレイを洗浄した後、第1の

電極 2 a と第 2 の電極 2 b との間に電圧を印加すると、生体分子により 2 つの電極 2 a および 2 b との間にブリッジが形成される。その後、電極のペア 2 a および 2 b の間の伝導性がペア毎に測定される。この測定結果を図 8 d に示す。最も高い伝導性を示した電極ペアは、ハイブリダイゼーション DNA 分子 3 および 5 の 2 つのブリッジを有するペアである。ブリッジ形成が 1 つの場合の伝導性はほぼ半分である。これは DNA 分子 3'' および 5'' のペアからわかる。第 2 の分子 3' 単独で形成されるブリッジでは、電極 2 a と 2 b との間の直接的な伝導性はほとんどゼロである。

【0045】

上記方法によれば、溶液中に存在する第 1 の生体分子を高感度で検出できる。特に、この感度は、第 1 の電極 2 a が占める密度によって増加される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の装置の第 1 の実施形態の例を示す。

【図 2】本発明の装置の第 2 の実施形態の例を示す。

【図 3】本発明の装置の第 3 の実施形態の例を示す。

【図 4】第 1 の方法の変形例を示す図である。

【図 5】第 2 の方法の変形例を示す図である。

【図 6】第 3 の方法の変形例を示す図である。

【図 7】a から c は、第 4 の方法の変形例のサブステップを示す図である。

【図 8】a から d は、第 5 の方法の変形例のサブステップ、および測定結果を示す図である。

【符号の説明】

1…基材

2 a、2 b…第 1、第 2 の電極

3、3'、3''…第 2 の DNA 分子

4…供給線

5、5'、5''…第 1 の DNA 分子

6…ゴールドクラスター

7…生体分子

7a...1本鎖ペプチドセクション

8...抗体

9...ヘアピンループ

10...電荷分子

E1...端

E2...第2の端

S...スペーサ

L...リンカ

【図1】

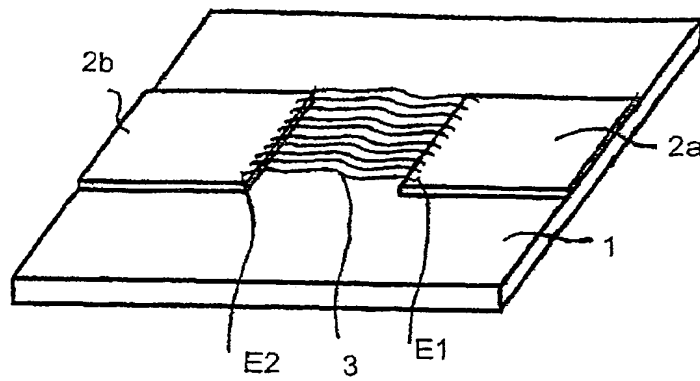


Fig. 1

【図2】

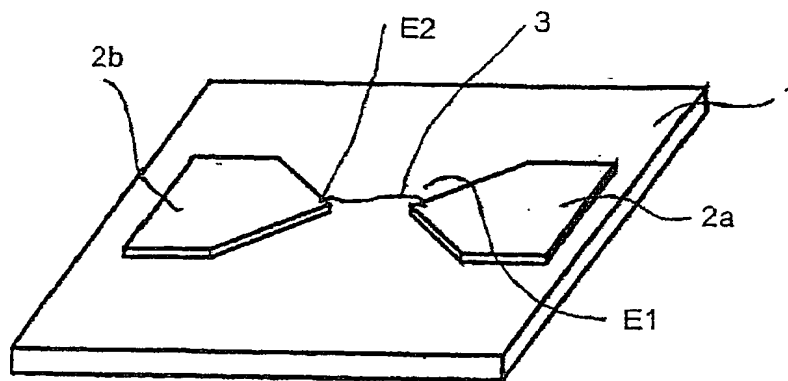


Fig. 2

【図3】

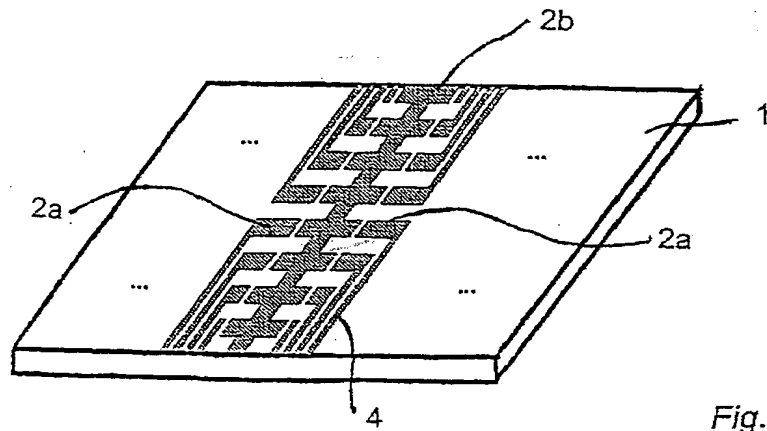


Fig. 3

【図4】

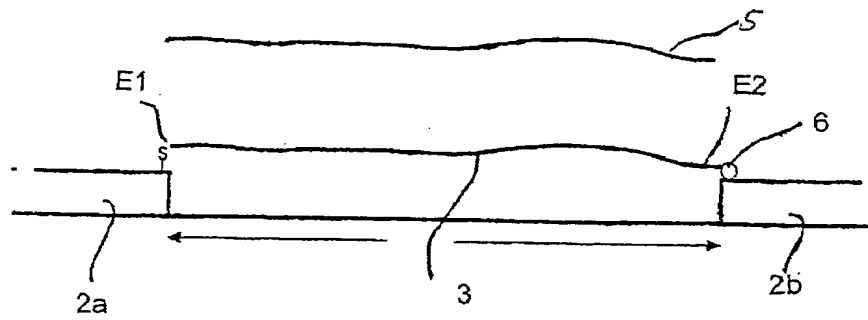


Fig. 4

【図5】

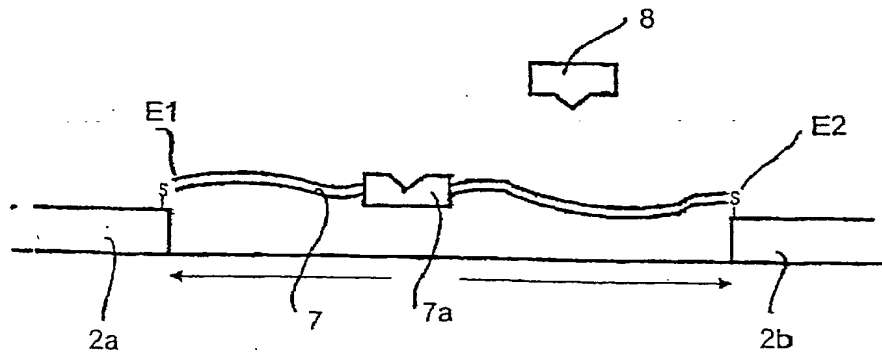


Fig. 5

【図 6】

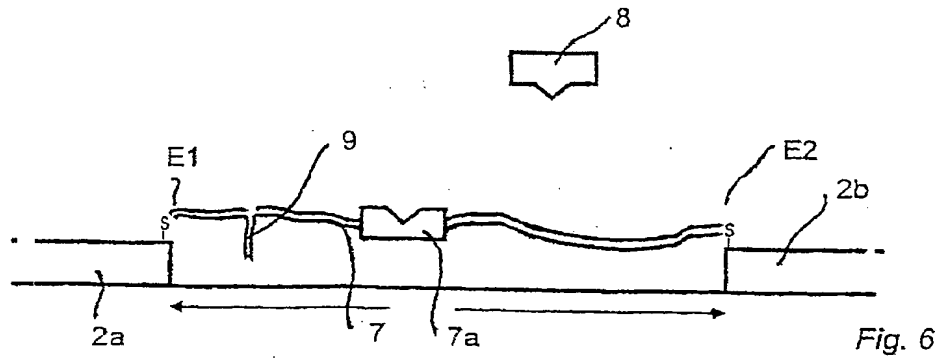


Fig. 6

【図 7 a】

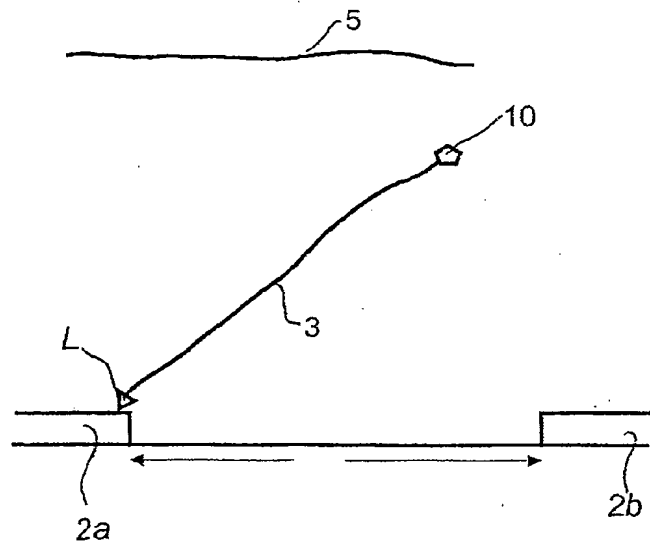


Fig. 7a

【図 7 b】

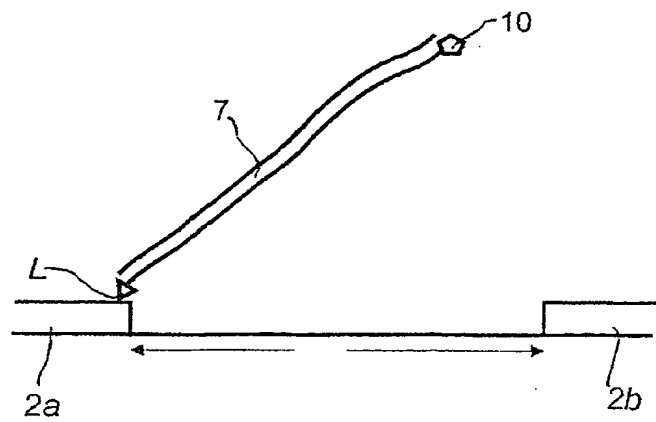


Fig. 7b

【図7c】

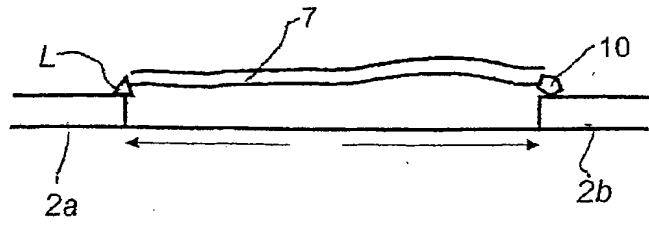


Fig. 7c

【図8a】

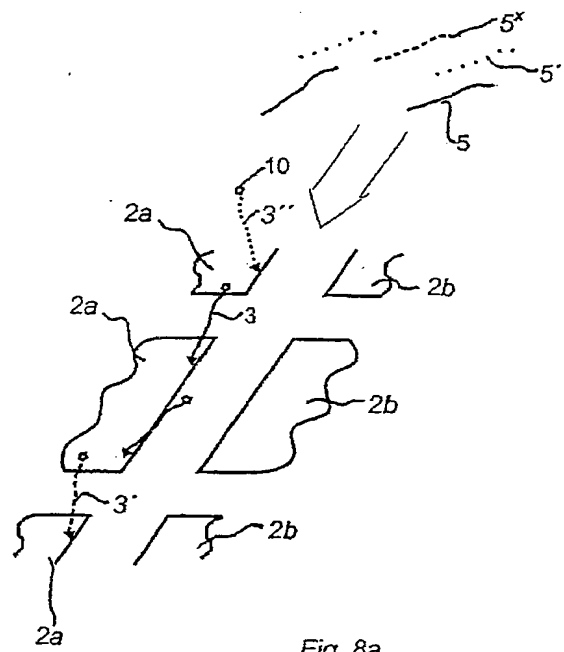
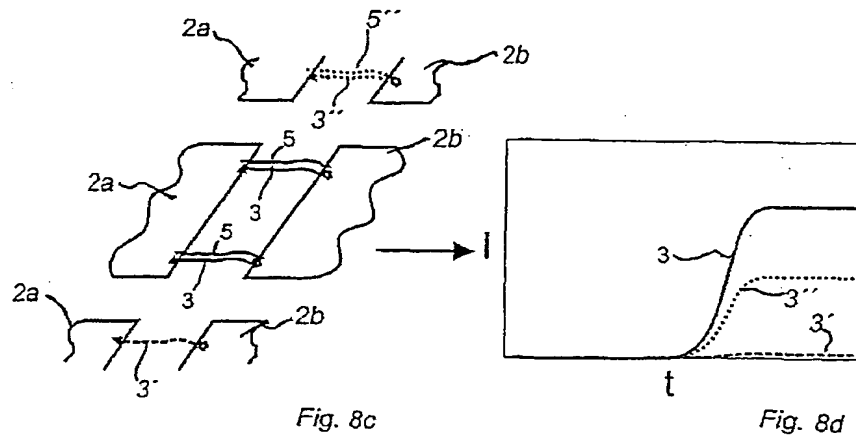


Fig. 8a

【図8d】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 00/04438

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 G01N27/26 H01L51/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q G01N H01L C07H G06N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 20162 A (GOZIN MICHAEL ;YU CHANGJUN (US); KAYYEM JON F (US); CLINICAL MICRO) 14 May 1998 (1998-05-14) page 9, line 15 - line 27; claim 1	1-37
X	US 5 770 369 A (FRASER SCOTT E ET AL) 23 June 1998 (1998-06-23) claims 1-14	1-37
X	WO 98 31839 A (HARVARD COLLEGE) 23 July 1998 (1998-07-23) claims 1-51	1-37
P,X	WO 00 60125 A (CONNOLLY DENNIS MICHAEL) 12 October 2000 (2000-10-12) page 3 -page 4, line 7	1-37
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 April 2002

Date of mailing of the international search report

11/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gabriels, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 00/04438

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H-W FINK ET AL: "Electrical conduction through DNA molecules" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 398, 1 April 1999 (1999-04-01), pages 407-410, XP002162319 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/DE 00/04438

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9820162 A	14-05-1998	US 6096273 A	01-08-2000
		US 6221583 B1	24-04-2001
		US 6090933 A	18-07-2000
		US 6232062 B1	15-05-2001
		AU 739375 B2	11-10-2001
		AU 5196798 A	29-05-1998
		EP 0939762 A2	08-09-1999
		JP 2001507930 T	19-06-2001
		WO 9820162 A2	14-05-1998
US 5770369 A	23-06-1998	US 5824473 A	20-10-1998
		US 5591578 A	07-01-1997
		US 6071699 A	06-06-2000
		US 6177250 B1	23-01-2001
		US 6277576 B1	21-08-2001
		US 6200761 B1	13-03-2001
		US 6238870 B1	29-05-2001
		US 6180352 B1	30-01-2001
		US 6268150 B1	31-07-2001
		US 6258545 B1	10-07-2001
		US 2001046679 A1	29-11-2001
		US 5952172 A	14-09-1999
		AU 6166296 A	30-12-1996
		EP 0871642 A1	21-10-1998
		WO 9640712 A1	19-12-1996
		US 6291188 B1	18-09-2001
		US 6265155 B1	24-07-2001
		AU 703329 B2	25-03-1999
		AU 1215295 A	27-06-1995
		CA 2178618 A1	15-06-1995
		EP 1172446 A2	16-01-2002
		EP 0733058 A1	25-09-1996
		JP 9506510 T	30-06-1997
		WO 9515971 A2	15-06-1995
		US 6268149 B1	31-07-2001
		US 5780234 A	14-07-1998
		US 5705348 A	06-01-1998
		US 2001034033 A1	25-10-2001
		US 6087100 A	11-07-2000
WO 9831839 A	23-07-1998	US 6306584 B1	23-10-2001
		AU 5926598 A	07-08-1998
		EP 0981643 A2	01-03-2000
		WO 9831839 A2	23-07-1998
WO 0060125 A	12-10-2000	AU 4216600 A	23-10-2000
		WO 0060125 A2	12-10-2000
		US 2002022223 A1	21-02-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)	
G 0 1 N	33/483	G 0 1 N	33/483	F
	33/53		33/53	M
	33/566		33/566	
// G 0 1 N	27/416		27/46	3 3 6 M
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B Z, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW				
(72)発明者 シューライン ユールゲン ドイツ連邦共和国 エルランゲン 91054 ノイエ シュトラーセ 26				
(72)発明者 ハスマン イエルク ドイツ連邦共和国 エルランゲン 91052 ホフマンシュトラーセ 118a				
F ターム(参考) 2G045 AA35 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 FB05 2G046 AA34 BA09 BB02 BB04 BC03 BC05 DC14 DC16 EB09 FA01 FA04 FE00 FE38 2G060 AA06 AC10 AD06 AE17 AE40 AF03 AF06 AF07 AF08 AF10 AG10 FA01 HA02 HC07 HC13 HD03 KA06 4B029 AA07 AA23 BB20 CC01 FA12 4B063 QA01 QA12 QA13 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QS16 QS34 QS39				

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.